糖皮质激素对鸡胚肝细胞脂肪和胆汁酸代谢相关基因表达的影响

周华金　杨家昶　张　辉　王继光　郝洋洋　杜　鹏　宋志刚*

（山东农业大学动物科技学院/动物医学院，泰安　271018）

摘　要：为揭示应激导致家禽肝脏代谢异常的机理，本研究探查了糖皮质激素——地塞米松（DEX）对鸡胚肝细胞脂肪和胆汁酸代谢相关基因表达的影响。选取 19 胚龄的无特定病原体(SPF)鸡蛋，原代培养鸡胚肝细胞（37 ℃、5% CO_2），用 0（对照）、200、500、1 000 nmol/L 的地塞米松分别处理 24 h。结果表明：与对照组相比，高剂量（500、1 000 nmol/L）地塞米松处理显著降低了脂肪代谢相关基因——脂肪酸转运蛋白 1（*FATP*-1）、固醇调节元件结合蛋白-1C（*SREBP*-1*C*）、载脂蛋白 B100（*APOB*100）、肝脏 X 受体（*LXR*）以及胆汁酸摄取相关基因 Na^+/牛磺胆盐共转运体（*NTCP*）的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$），显著提高了胆汁酸排出相关基因——胆盐输出泵（*BSEP*）的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）；低剂量（200 nmol/L）地塞米松处理显著提高胆汁酸合成相关基因——胆固醇 7-羟化酶（*CYP7A*1）和法尼酯 X 受体（*FXR*）的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$），同时，*SREBP*-1*C* 的 mRNA 相对表达水平显著降低（$P<0.05$），*BSEP* 的 mRNA 相对表达水平显著上升（$P<0.05$）。由此表明，高剂量糖皮质激素对鸡胚肝细胞的脂肪合成、转运和胆汁酸的摄取具有抑制作用；低剂量糖皮质激素可以促进胆汁酸的合成和排出，部分反应具有剂量依赖性。

关键词：糖皮质激素；鸡胚肝细胞；脂肪代谢；胆汁酸合成；基因表达

中图分类号：S831　　　　　　文献标识码：　　　　　　　文章编号：

应激导致家禽能量代谢异常，阐明糖皮质激素影响肝脏脂肪、胆汁酸合成的途径对揭示应激机理、制定防控策略意义重大。糖皮质激素参与机体脂肪代谢，肥胖糖尿病小鼠模型和一些胰岛素抵抗患者体内糖皮质激素水平升高，并与脂肪肝和高血糖的发生相关[1-2]。合成的和天然的糖皮质激素都能够高度调节肝脏脂肪代谢，在小鼠原代肝细胞上的研究表明，地塞米松（dexamethasone，DEX）促进蛋白质依赖性脂肪酸的摄取，增加三酰甘油和鞘脂的积累[3]。此外，糖皮质激素参与胆汁酸代谢，小鼠肝脏特异性敲除糖皮质激素受体基因后，

收稿日期：2018-04-05

基金项目：国家自然科学基金项目(31472115)；山东省家禽产业创新团队项目（STAIT-011-08)

作者简介：周华金（1993—），女，山东聊城人，硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: 1667569088@qq.com

*通信作者：宋志刚，教授，博士生导师，E-mail: naposong@qq.com

胆囊中胆汁酸的含量降低[4]；糖皮质激素通过诱导胆固醇 7α-羟化酶（cholesterol7-alpha hydroxyl-lase, CYP7A1）的活性来调节大鼠肝细胞中胆汁酸的合成[5]。肉鸡饮水中添加地塞米松抑制了三羧酸循环和脂肪酸氧化，促进了肉鸡肝脏脂肪酸从头合成[6]。目前，有关应激调控家禽肝脏代谢的研究多基于活体试验，所得结果是糖皮质激素、胰岛素等多个因素的共同影响，尚需通过体外试验探究糖皮质激素的直接效应。因此，本试验使用不同浓度的地塞米松处理鸡胚肝细胞，通过反转录 PCR（RT-PCR）技术对脂肪、胆汁酸合成相关基因进行定量，以揭示糖皮质激素的单一影响，为深入研究应激影响家禽能量代谢的机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

地塞米松注射液（5 mg/mL）购自山东鲁抗晨欣药业有限公司，RNA 提取试剂盒购自康为试剂生物有限公司（CW0584），反转录试剂盒（编号：4897030001）购自罗氏公司，Real Time PCR 试剂盒（编号：4913914001）购自罗氏公司。固醇调节元件结合蛋白-1C（sterol regulatory element-binding protein-1c, *SREBP*-1*C*）、肝脏 X 受体（liver X receptor, *LXR*）、载脂蛋白 B（apolipoprotein B, *APOB*）100、脂肪酸转运蛋白 1（fatty acid transport protein 1, *FATP*-1）、*CYP7A*1、法尼酯 X 受体（farnesoid X receptor, *FXR*）、胆盐输出泵（bile salt export pump, *BSEP*）和胆汁酸摄取相关基因 Na+/牛磺胆盐共转运体（Na+/taurocholate co-transporting polypeptide, *NTCP*）基因的引物序列见表 1，由上海生工生物技术有限公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法[7]定量目标基因的 mRNA 相对表达水平，以β-肌动蛋白（β-actin）作为参照基因进行校准。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequence

基因 Genes	GenBank 序号 GenBank number	方向 Orientation	引物序列 Primers sequences (5′→3′)
固醇调节元件结合蛋白-1C *SREBP*-1*C*	AY029224	F	GCCCTCTGTGCCTTTGTCTTC
		R	ACTCAGCCATGATGCTTCTTCC
肝脏 X 受体 *LXR*	AJ507202	F	GTCCCTGACCCTAATAACCGC
		R	GTCTCCAACAACATCACCTCTATG
载脂蛋白 B100 *APOB*100	M18421	F	CACGCCTCACAGACCAAGTA
		R	CCAGTCAAACGGCACATCTA
脂肪酸转运蛋白 1 *FATP*-1	DQ352834	F	TACAATGTGCTCCAGAAGGG

		R	GTCTGGTTGAGGATGTGACTC
胆固醇 7-羟化酶 *CYP7A1*	AY700578	F	GATCTTCCCAGCCCTTGTGG
		R	AGCCTCTCCCAGCTTCTCAC
法尼酯 X 受体 *FXR*	AF492497	F	AGTAGAAGCCATGTTCCTCCGTT
		R	GCAGTGCATATTCCTCCTGTGTC
胆盐输出泵 *BSEP*	XM_015289699	F	TGGAATAGAGCGTGGCTTTT
		R	CATTGGCAGTCATCTCAGGA
胆汁酸摄取相关基因 Na^+/牛磺胆盐共转运体 *NTCP*	XM_015287931	F	AGACAGGGATGGTTGTGCTT
		R	CTGAGGGGAGATGGTGATGT
β-肌动蛋白 β-actin	NM_205518.1	F	CTGGCACCTAGCACAATGAA
		R	CTGCTTGCTGATCCACATCT

F：上游 forward；R：下游 reverse。

1.2 试验设计

选取 19 胚龄的无特定病原体(SPF)鸡蛋，原代培养鸡胚肝细胞，细胞以 1×10^6 个/mL 密度接种于一个 6 孔板中，每个孔作为 1 个重复，常规（37 ℃、5% CO_2）培养，每 24 h 更换一次培养液。培养 72 h 后根据试验处理不同分别加入 0（对照）、200、500 和 1 000 nmol/L 的地塞米松，继续培养 24 h 后分别收集细胞上清液、肝细胞，利用 RT-PCR 技术进行基因定量。

1.3 基因定量

反转录条件为：55 ℃，30 min（反转录反应）；85 ℃，5 min（反转录酶的失活反应）。两步法荧光定量 PCR 反应条件为：第 1 步 95 ℃变性 10 s，1 个循环，第 2 步 95 ℃延伸 5 s，60 ℃退火 34 s，40 个循环。

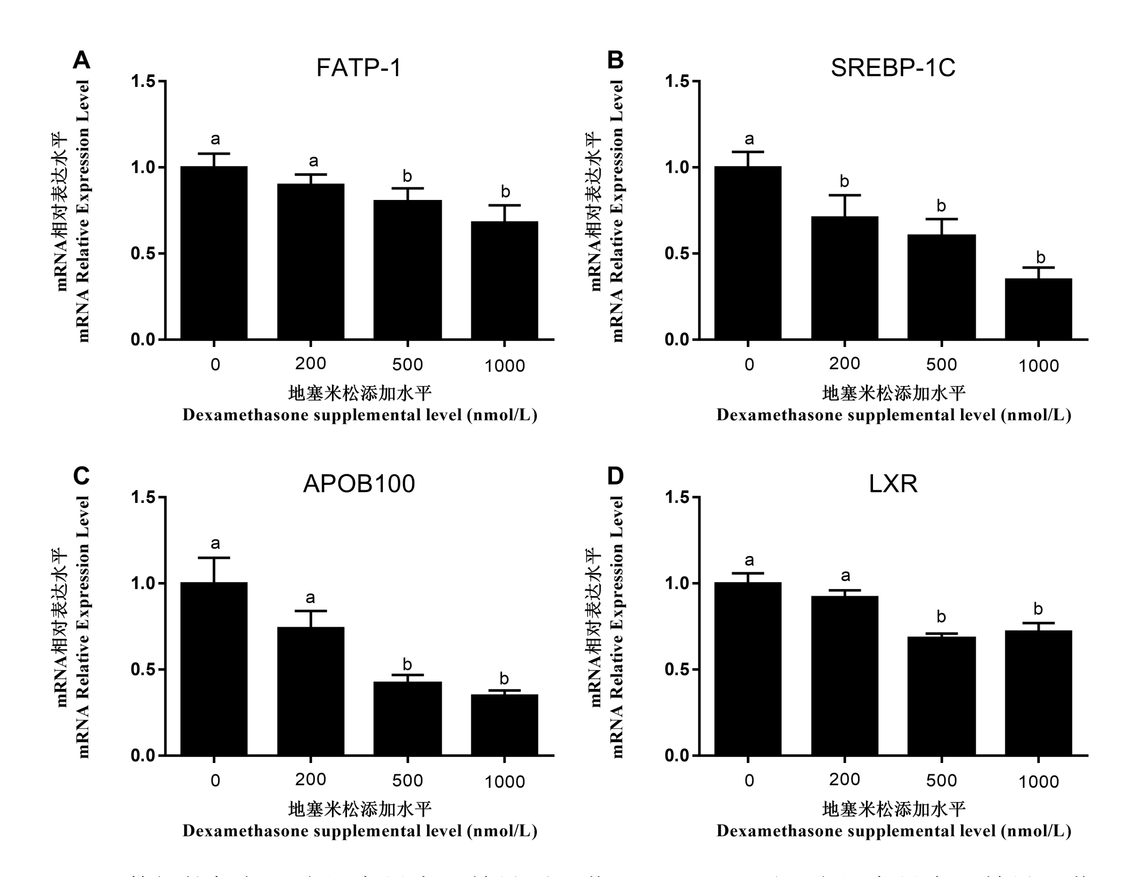
1.4 统计分析

使用 SAS 9.0 软件中 GLM 程序对试验数据进行单因素方差分析（one-way ANOVA），平均值采用 Tukey's HSD 法进行多重比较，P<0.05 表示差异显著。

2 结 果

2.1 地塞米松对鸡胚肝细胞脂肪代谢相关基因 mRNA 相对表达水平的影响

由图 1-A、图 1-C、图 1-D 可知，与对照组相比，500 和 1 000 nmol/L 地塞米松处理分别显著降低了鸡胚肝细胞 *FATP*-1、*APOB*100 和 *LXR* 的 mRNA 相对表达水平（P＜0.05）；由图 1-B 可知，200、500、1 000 nmol/L 地塞米松处理均显著降低了鸡胚肝细胞 *SREBP*-1*C* 的 mRNA 相对表达水平（P＜0.05）。



数据柱标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)，不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下图同。

Value columns with the same small letter mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letters mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

图 1　地塞米松对鸡胚肝细胞脂肪代谢相关基因 mRNA 相对表达水平的影响

Fig.1　Effects of DEX on mRNA relative expression levels of fat metabolism related genes in chicken embryo hepatocyte

2.2　地塞米松对鸡胚肝细胞胆汁酸代谢相关基因 mRNA 相对表达水平的影响

由图 2-A、图 2-B 可知，与对照组相比，200 nmol/L 地塞米松处理显著提高了鸡胚肝细胞 *CYP7A1* 和 *FXR* 的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）；由图 2-C 可知，500 和 1 000 nmol/L 地塞米松处理显著降低了鸡胚肝细胞 *NTCP* 的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）；由图 2-D 可知，200、500 和 1 000 nmol/L 地塞米松处理均显著提高了鸡胚肝细胞 *BSEP* 的 mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）。

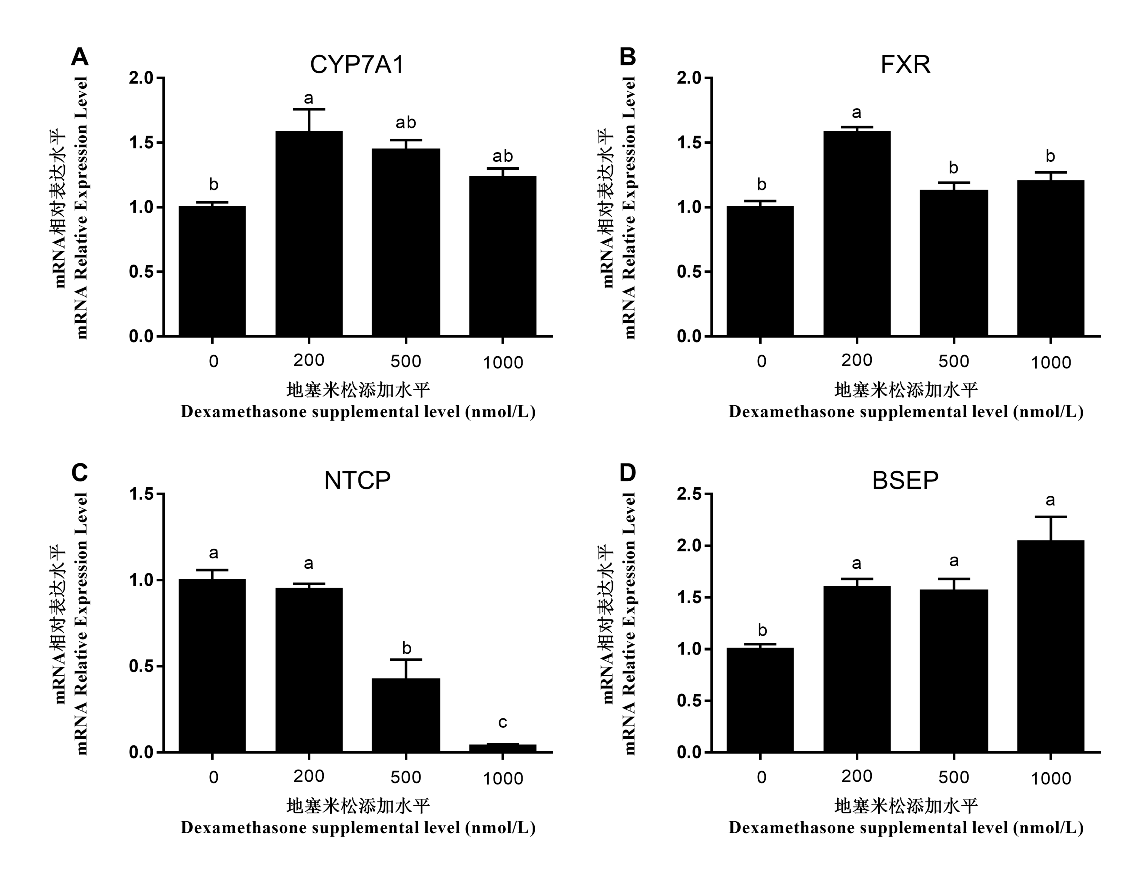


图 2　地塞米松对鸡胚肝细胞胆汁酸代谢相关 mRNA 相对表达水平的影响

Fig.2　Effects of DEX on mRNA relative expression levels of bile acid metabolism in chicken embryo hepatocyte

3　讨　论

3.1　糖皮质激素与鸡胚肝细胞脂肪代谢

在禽类，脂肪酸的合成反应与哺乳动物相同，脂肪酸和甘油三酯的合成主要在肝脏，并受多种蛋白质的调节。有研究表明，糖皮质激素与脂肪代谢密切相关，大鼠按 0.05 mg/kg 剂量每天灌服地塞米松 7 周后，肝脏脂肪含量下降，脂肪合成相关基因：脂肪酸结合蛋白-1（*FABP*-1）、过氧化物酶体增殖物激活受体γ（*PPARγ*）和谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶（*GPAT*）基因在肝脏中的 mRNA 相对表达水平下降[8]，提示地塞米松具有抑制脂肪合成的作用。在肝脏，脂肪酸可以通过脂肪酸转运蛋白（fatty acid transport protein，FATP）家族介导的主动吸收穿越质膜，其中 FATP-1 可以促进长链脂肪酸进出细胞的通量，此外，FATP-1 可通过调节细胞内脂肪酸酰化作用而影响细胞内脂肪酸代谢和脂质蓄积[9-10]。在本研究中，高剂量地塞米松处理显著降低了鸡胚肝细胞 *FATP*-1 的 mRNA 相对表达水平，表明糖皮质激素对肝细胞脂肪酸合成具有抑制作用。

LXR 和 SREBP-1C 同样在脂肪合成过程中发挥关键作用。LXR 是胆固醇水平的感受器，

并能调节与胆固醇吸收、转运、流出、排泄有关的一系列基因，其过度表达会使脂肪合成相关酶的基因转录明显加强。在朗德鹅上的研究发现，*LXRα*的 mRNA 相对表达水平增加可促进鹅肝脏脂肪沉积[11]。在甘油三酯的合成中，脂肪酸合成酶（FAS）和乙酰辅酶 A（ACC）是限速酶。*FAS* 和 *ACC* 的表达受 SREBP-1C 的调控[12]。当细胞内胆固醇含量过高，LXRs 激活 *SREBP*-1*C*，后者可增加油酸的合成，增多的不饱和脂肪酸与过多的胆固醇酯化，从而促进胆固醇的储存；而减少 LXRs 的激活可抑制 *SREBP*-1*C* 的转录，从而减少脂肪形成和甘油三酯合成。在本研究中，高剂量地塞米松处理显著降低了 *LXR* 和 *SREBP*-1*C* 的 mRNA 相对表达水平，同样表明糖皮质激素对脂肪合成具有抑制作用。

APOB 是极低密度脂蛋白（VLDL）的组成成分，是脂蛋白合成、分泌、运输的骨架蛋白，对能量转运、代谢等有显著作用。VLDL 将甘油三酯从肝脏运送到外周组织，肝细胞内过量合成 APOB 导致血浆中 VLDL 和低密度脂蛋白（LDL）含量升高，可引发动脉粥样硬化等心脑血管疾病，还可导致肝脏细胞内脂质积累，引发脂肪肝[13]。此外，鸡 *APOB* 基因 SNP（T123G）对腹脂和腹脂率有显著影响[14-15]。在本研究中，高剂量地塞米松处理显著下调了肝细胞 *APOB*100 的 mRNA 相对表达水平，提示糖皮质激素具有抑制脂蛋白组装转运的作用。

3.2　糖皮质激素与鸡胚肝细胞胆汁酸代谢

胆汁酸在肝脏实质细胞中由胆固醇合成，CYP7A1 是胆汁酸合成的限速酶[16]。研究表明，糖皮质激素对胆汁酸合成具有剂量依赖性刺激作用，50 nmol/L 地塞米松处理大鼠肝细胞发现，第 2 天和第 3 天胆汁酸的合成水平分别上升了 3 倍和 7 倍；1 μmol/L 地塞米松处理 2 d 后，肝细胞胆汁酸合成水平上升了 2.2 倍[17]。糖皮质激素通过诱导 CYP7A1 活性调节大鼠肝细胞胆汁酸合成[5]。地塞米松和甲状腺素联合作用能显著提升人和大鼠肝细胞中总胆汁酸的合成，使胆酸的含量提高了 23%，二羟胆酸的含量提高了 77%，CYP7A1 的活性也提高，在培养的肝细胞上，27-羟化酶 mRNA 并不自然出现，培养液中添加地塞米松 72 h 后，27-羟化酶 mRNA 出现，说明地塞米松可提高 CYP7A1 和固醇 27 羟化酶的活性从而调节胆汁酸合成[18]。与前人研究相似，本研究中低水平地塞米松处理促进了 *CYP7A*1 的 mRNA 相对表达水平，证实了糖皮质激素可促进胆汁酸的合成。

NTCP 位于肝细胞基底膜，是摄取胆汁酸的主要转运体。有报道证明，地塞米松是大鼠肝脏中 BSEP 的强效诱导剂，大鼠肝细胞在 100 nmol/L 地塞米松的培养基中培养 4 d 后，BSEP 具有较强的功能活性[17]，这与本研究中地塞米松诱导 BSEP 的 mRNA 相对表达水平上升的结果相一致。

有研究表明，CYP7A1 受到 FXR 的负反馈调控，在肝脏中，FXR 通过激活下游靶基因 SHP 抑制 *CYP7A1* 的表达，减少了胆汁酸的合成[19-20]。此外，肝脏中的 FXR 被胆汁激活后，下调了 *NTCP* 的基因表达，提高了胆汁酸外流转运体 *BSEP* 的基因表达[21-22]。在本研究中，200 nmol/L 地塞米松处理促进了鸡肝细胞 *CYP7A1* 和 *FXR* 的 mRNA 相对表达水平，500 和 1 000 nmol/L 地塞米松处理抑制了 *NTCP* 的 mRNA 相对表达水平，提高了 *BSEP* 的 mRNA 相对表达水平，提示低水平糖皮质激素可以促进鸡胚肝细胞胆汁酸的合成和排出，高水平糖皮质激素抑制胆汁酸摄取。

4　结　论

高剂量糖皮质激素对鸡胚肝细胞的脂肪合成、转运和胆汁酸的摄取具有抑制作用；低剂量糖皮质激素可以促进胆汁酸的合成和排出，部分反应具有剂量依赖性。

致谢：感谢山东农业大学动物科技学院赵景鹏老师对论文撰写的指导。

参考文献：

[1]　ROSE A J,HERZIG S.Metabolic control through glucocorticoid hormones:an update[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2013,380(1/2):65–78.

[2]　LIVINGSTONE D E,GRASSICK S L,CURRIE G L,et al.Dysregulation of glucocorticoid metabolism in murine obesity:comparable effects of leptin resistance and deficiency[J].Journal of Endocrinology,2009,201(2):211–218.

[3]　HARASIM-SYMBOR E,KONSTANYNOWICZ-NOWICKA K,CHABOWSKI A.Additive effects of dexamethasone and palmitate on hepatic lipid accumulation and secretion[J].Journal of Molecular Endocrinology,2016,57(4):261–273.

[4]　ROSE A J,DÍAZ M B,REIMANN A,et al.Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor[J].Cell Metabolism,2011,14(1):123–130.

[5]　PRINCEN H M,MEIJER P,HOFSTEE B.Dexamethasone regulates bile acid synthesis in monolayer cultures of rat hepatocytes by induction of cholesterol 7α-hydroxylase[J].Biochemical Journal,1989,262(1):341–348.

[6]　LV Z P,PENG Y Z,ZHANG B,et al.Glucose and lipid metabolism disorders in the chickens with dexamethasone-induced oxidative stress[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2018,102(2):e706–e717.

[7]　LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J].Methods,2001,25(4):402–408.

[8] WU T,YANG L,JIANG J G,et al.Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats[J].Life Sciences,2018,192:173–182.

[9] QI R L,FENG M,TAN X,et al.FATP1 silence inhibits the differentiation and induces the apoptosis in chicken preadipocytes[J].Molecular Biology Reports,2013,40(4):2907–2914.

[10] MARTIN G,POIRIER H,HENNUYER N,et al.Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target[J].Journal of Biological Chemistry,2000,275(17):12612–12618.

[11] 韩春春,黄晓宇,王继文.鹅 *LXRα*基因的克隆及填饲对其 mRNA 水平的影响[J].畜牧兽医学报,2009,40(9):1405–1409.

[12] AOKI N,YOSHIDA D,ISHIKAWA R,et al.A single daily meal at the beginning of the active or inactive period inhibits food deprivation-induced fatty liver in mice[J].Nutrition Research,2014,34(7):613–622.

[13] 张晾,张燕燕,叶玲敏,等.多不饱和脂肪酸饮食对载脂蛋白 E 缺失小鼠含载脂蛋白 B100 脂蛋白代谢的影响[J].生物化学与生物物理进展,2015,42(9):843–849.

[14] 张森,石慧,李辉.鸡 *apoB* 基因 T123G 多态位点与生长和体组成性状的相关性研究[J].畜牧兽医学报,2006,37(12):1264–1268.

[15] 高广亮,张庆秋,李辉,等.鸡肝细胞中 *L-BABP* 基因表达对脂类代谢基因及甘油三酯和总胆固醇的影响[J].畜牧兽医学报,2015,46(1):32–40.

[16] LI T G,CHIANG J Y L.Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy[J].Pharmacological Reviews,2014,66(4):948–983.

[17] WARSKULAT U,KUBITZ R,WETTSTEIN M,et al.Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes[J].Biological Chemistry,1999,380(11):1273–1279.

[18] ELLIS E,GOODWIN B,ABRAHAMSSON A,et al.Bile acid synthesis in primary cultures of rat and human hepatocytes[J].Hepatology,1998,27(2):615–620.

[19] WANG L,LEE Y K,BUNDMAN D,et al.Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production[J].Developmental Cell,2002,2(6):721–731.

[20] KERR T A,SAEKI S,SCHNEIDER M,et al.Loss of nuclear receptor SHP impairs but does

not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis[J].Developmental Cell,2002,2(6):713–720.

[21] ZOLLNER G,WAGNER M,FICKERT P,et al.Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver[J].American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,2005,289(5):G798–G805.

[22] PLASS J R M,MOL O,HEEGSMA J,et al.Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump[J].Hepatology,2002,35(3):589–596.

Effects of Glucocorticoids on Expression of Lipid and Bile Acid Metabolism Related Genes in Chicken Embryo Hepatocytes

ZHOU Huajin YANG Jiachang ZHANG Hui WANG Jiguang HAO yangyang DU Peng SONG Zhigang*

（*Collage of Animal Science and Collage of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an* 271018, *China*）

Abstract: In order to reveal the mechanism of stress-induced metabolism disorders of liver in poultry, this study explored the effect of glucocorticoid—dexamethasone (DEX) on the expression of fat and bile acid metabolism related genes in chicken embryo hepatocytes. Nineteen embryo age specific pathogen free (SPF) eggs were selected, and primary cultured （37 ℃, 5% CO_2） chicken embryo hepatocytes were treated with 0 (control), 200, 500, and 1 000 nmol/L dexamethasone respectively for 24 h. The results showed as follows: compared with the control group, treated with the high dose (500 or 1 000 nmol/L) dexamethasone significantly reduced the mRNA relative expression levels of fat metabolism related genes, such as fatty acid transporter 1 (*FATP*-1), sterol regulatory element binding protein -1C (*SREBP*-1*C*), apolipoprotein B100 (*APOB*100) and liver X receptor (LXR) (P<0.05), and the mRNA relative expression level of bile acid uptake related gene Na^+/taurocholate co-transporting polypeptide（*NTCP*）was also reduced (P<0.05); While the mRNA relative expression level of bile acid excretion related gene bile salt output pump (*BSEP*) was significantly increased (P<0.05); treated with the low dose (200 nmol/L)

*Corresponding author, professor, E-mail: naposong@qq.com （责任编辑 武海龙）

dexamethasone significantly increased the mRNA relative expression levels of bile acid synthesis related genes cholesterol7-alpha hydroxylase (*CYP7A1*) and farnesoid X receptor (*FXR*) (*P*<0.05), meanwhile, the *SREBP*-1*C* mRNA relative expression level was significantly decreased (*P*<0.05), and the *BSEP* mRNA relative expression level was significantly increased (*P*<0.05). In conclusion, high dose glucocorticoids can inhibit the synthesis and transport of fat and bile acid intake in chicken embryo hepatocytes, while low dose glucocorticoids can promote the synthesis and excretion of bile acids, some of these reactions have a dose-dependent response.

Key words: glucocorticoids; chicken embryos hepatocyte; fat metabolism; bile acid synthesis; gene expression